

II. DETERMINACION COLORIMETRICA DEL PALMITATO DE SITOSTEROL

POR

R. GARCIA FAURE, F. GARCIA OLMEDO, I. SOTELO ABOY
y M. SALTO ANDREU

INTRODUCCION

Walde y Mangel (1930) estudiaron los extractos acetónicos de las harinas de una variedad de *Triticum durum* y otra de *Triticum aestivum* (incl. *T. vulgare*); encontraron que la sustancia grasa de esta última contenía una cantidad apreciable de sustancia cristalina, mientras que la de *T. durum* no presentaba cristales y era menos viscosa. Ambos extractos daban reacción positiva de Liebermann-Burchard, pero el desarrollo de color era más lento en el de *T. durum*. También encontraron estos autores que el extracto de *T. aestivum*, disuelto en acetona y llevado a 0° C., separaba un precipitado que no aparecía en el de *T. durum*. Dicho precipitado fue estudiado por Spielman (1933), siendo identificado como el ester palmítico de una mezcla de sitosterol y sitostanol. Walde y Mangel fueron, por tanto, los primeros en sugerir la presencia de palmitato de sitosterol como posible carácter específico de *T. aestivum*.

Matweef (1952) investigó la presencia del palmitato de sitosterol en *T. durum* y *T. aestivum* por un procedimiento basado en las observaciones de Walde y Mangel, encontrando que las variedades de *T. aestivum* contenían de 15 a 20 mg./100 g. de dicha sustancia, mientras que las de *T. durum* carecían totalmente de ella.

Las investigaciones posteriores sobre el tema han puesto en duda tanto la adecuación del procedimiento analítico seguido por Matweef como la consistencia de la supuesta diferencia entre las dos especies.

Fabriani y Fratoni (1955) y Montefredine y Laporta (1955) afirmaron haber encontrado excepciones tanto en *T. aestivum* como en *T. durum*. Alliot (1957) realizó un ensayo comparativo entre muestras puras y muestras comerciales de *T. durum*, llegando a la conclusión de que la presencia de pequeñas cantidades de palmitato de sitosterol en las muestras comerciales era debida a la habitual impurificación de éstas por *T. aestivum*. Matweef (1964) ha admitido la existencia de variedades de *T. aestivum* con bajo contenido en palmitato, pero ha negado que haya variedades de *T. durum* que contengan dicha sustancia.

Brogioni (1957), Zoubovski (1958) y Guillbot (1961) han realizado sendas revisiones del método analítico, siendo la opinión generalizada que éste es inseguro y poco reproducible. Guillbot intentó, sin éxito, desarrollar un método basado en las determinaciones globales del esterol libre y esterificado por cromatografía en reversión de fase.

En el presente trabajo se ha desarrollado un método que permite determinar el palmitato de sitosterol sin ambigüedad y se ha investigado si la supuesta diferencia interespecífica es consistente y significativa.

MATERIAL Y METODOS

En este estudio hemos utilizado las mismas harinas y pastas alimenticias que en el método espectrofotométrico en el infrarrojo.

Todos los reactivos empleados fueron de la casa Merck, A. G. (pro-analysis), excepto el beta-sitosterol y el palmitato de metilo, que fueron suministrados por Fluka A. G. (react.).

El reactivo estable para la reacción de Liebermann-Burchard (100 ml. de ácido sulfúrico, 300 ml. de ácido acético, 600 ml. de anhídrido acético y 20 g. de sulfato sódico anhidro, mezclados a 0° C) ha sido preparado según Huang y colaboradores (1961).

El reactivo de cloruro de cinc para la reacción de Tchugaeff (40 g. de cloruro de cinc fundido y 150 ml. de ácido acético glacial, mezclados a 80° C) se preparó según Hanel y Dam (1955).

El palmitato de sitosterol se ha sintetizado según Bergman y colaboradores (1964) y se recrystalizó tres veces a partir de acetona.

La separación del palmitato de sitosterol a partir de la harina o de la

pasta molida se ha llevado a cabo según el siguiente procedimiento: Se toman 150 g. de la muestra molida (debe pasar el tamiz del 70 y tener menos del 15 por 100 de humedad) y se someten a maceración en 300 ml. de acetona (p. e. (punto de ebullición), 58° C.). Después de agitar, se coloca en una estufa a 38° C., durante veinticuatro horas, agitando cuatro veces a lo largo de este período. Se filtra a continuación, manteniéndose la temperatura del embudo alrededor de los 60° C., con objeto de evitar la posible insolubilización de parte del extracto. Dos alícuotas de 50 ml. de filtrado se llevan a — 5° C. durante dos horas, para que se produzca la precipitación del palmitato de sitosterol. Se separa éste rápidamente por filtración, manteniendo el embudo por debajo de los 5° C., para evitar su redisolución. El precipitado se recupera lavando el filtro con éter y eliminando este disolvente con evaporación. A continuación se disuelve el precipitado en 15 ml. de cloroformo.

La determinación del palmitato de sitosterol por la reacción de Liebermann-Burchard se ha llevado a cabo añadiendo 11 ml. del reactivo descrito por Huang y colaboradores (1961), a 5 ml. de la solución clorofórmica del precipitado y dejando transcurrir la reacción a 50° C. durante cuarenta y cinco minutos. La densidad óptica se ha medido a 425 milimicras con un Specker Absorptiometer Hilger (espesor, 2 cm.).

La reacción colorimétrica de Tchugaeff se ha aplicado según el siguiente procedimiento: A 1 ml. de solución clorofórmica del precipitado se le añaden 2 ml. de cloroformo, 1 ml. de cloruro de acetilo y 1 ml. de reactivo de cloruro de cinc. Después de mantener la mezcla reaccionante a 50° C. durante veinte minutos, se determina la densidad óptica a 525 milimicras en un espectrocolorímetro Spectronic (espesor 1/2 pulgada).

La cromatografía en capa fina se ha realizado, según Stahl, con un equipo Pleuger.

RESULTADOS Y DISCUSION

Separación del palmitato de sitosterol.

Según Matweef (1952), el palmitato de sitosterol se separa en forma de precipitado al llevar a — 5° C. el extracto acetónico de la harina o de la pasta molida. La extracción debe hacerse utilizando acetona con agua hasta el 9 por 100, teniendo en cuenta la humedad de la muestra, si bien puede prescindirse de este requisito, ya que no se han encontrado diferencias sig-

estabilidad del reactivo; *b*) Inestabilidad de los colores formados (figuras 1 y 2). Buena parte de las discrepancias encontradas por diversos autores al aplicar el método de Matweff (1952) pueden ser adscritas a la no consideración de estas circunstancias.

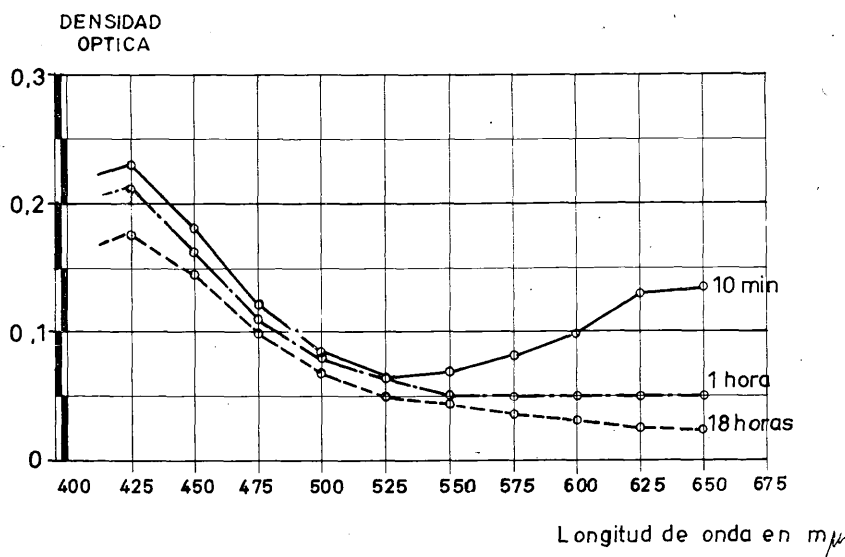


FIGURA 1.
Reacción de Liebermann-Burchard. Espectros visibles.

La cinética del desarrollo de color en la reacción mencionada es extremadamente sensible a la concentración de ácido sulfúrico en la mezcla de reacción (figura 2) y a la temperatura. Por esta razón resulta de gran importancia la utilización, a temperatura controlada, de un reactivo adecuadamente normalizado.

Huang y colaboradores (1961) han descrito un reactivo para la reacción de Liebermann-Burchard que permanece estable durante más de seis semanas. Estos autores realizan la reacción a temperatura ambiente y miden la densidad óptica a 550-610 milimicras. Ness y colaboradores (1964) han empleado el mismo reactivo a 0° C., midiendo la densidad óptica a 520-530 milimicras para salvar algunas de las dificultades que presenta la determinación del colesterol en el suero. Hemos comprobado que dicho reactivo desarrolla un color estable a 425 milimicras (figura 2), dependiendo, la densidad óptica alcanzada y el tiempo de estabilización, de la temperatura. A 50° C.,

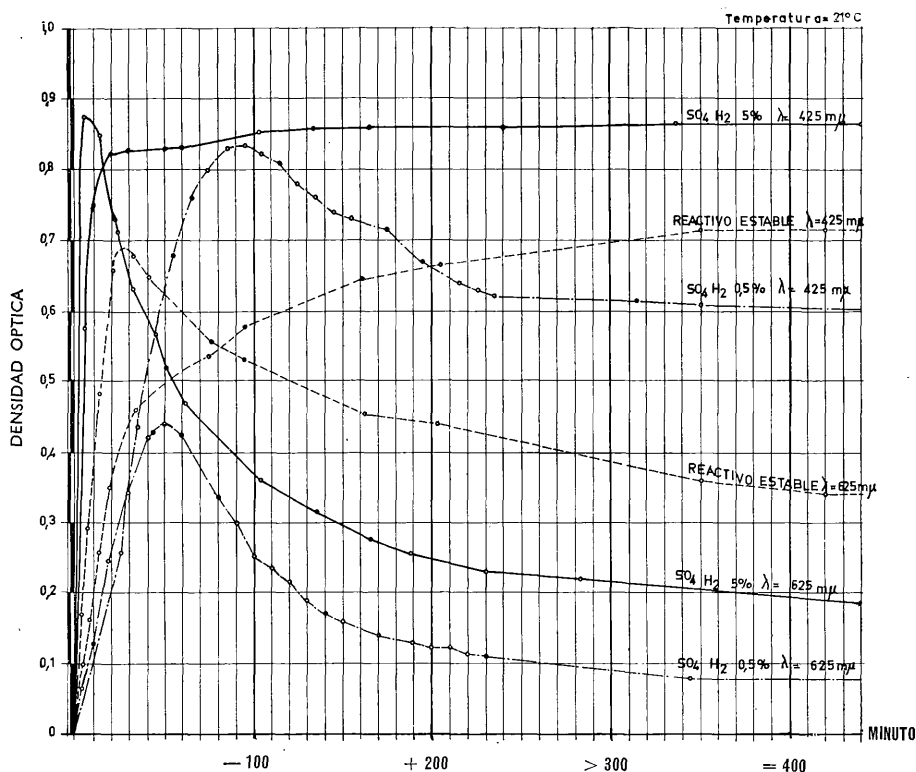


FIGURA 2.

Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la reacción de Liebermann-Burchard.

bastan cuarenta minutos para alcanzar un valor estable y se cumple la ley de Lambert-Beer (figura 3).

Hemos aplicado la reacción de Tchugaeff, empleada con éxito por diversos autores en la colorimetría del colesterol, a la determinación del palmitato de sitosterol, según el método basado en el descrito por Hanel y Dam (1955). Llevando a cabo la reacción a 50° C. durante veinte minutos, se cumple la ley de Lambert-Beer. Esta reacción es bastante más sensible que la anterior, en las condiciones descritas.

Ensayo del método propuesto. Reproductividad.

En el cuadro II se exponen los resultados obtenidos por los dos métodos colorimétricos y por el gravimétrico para una serie de pastas preparadas

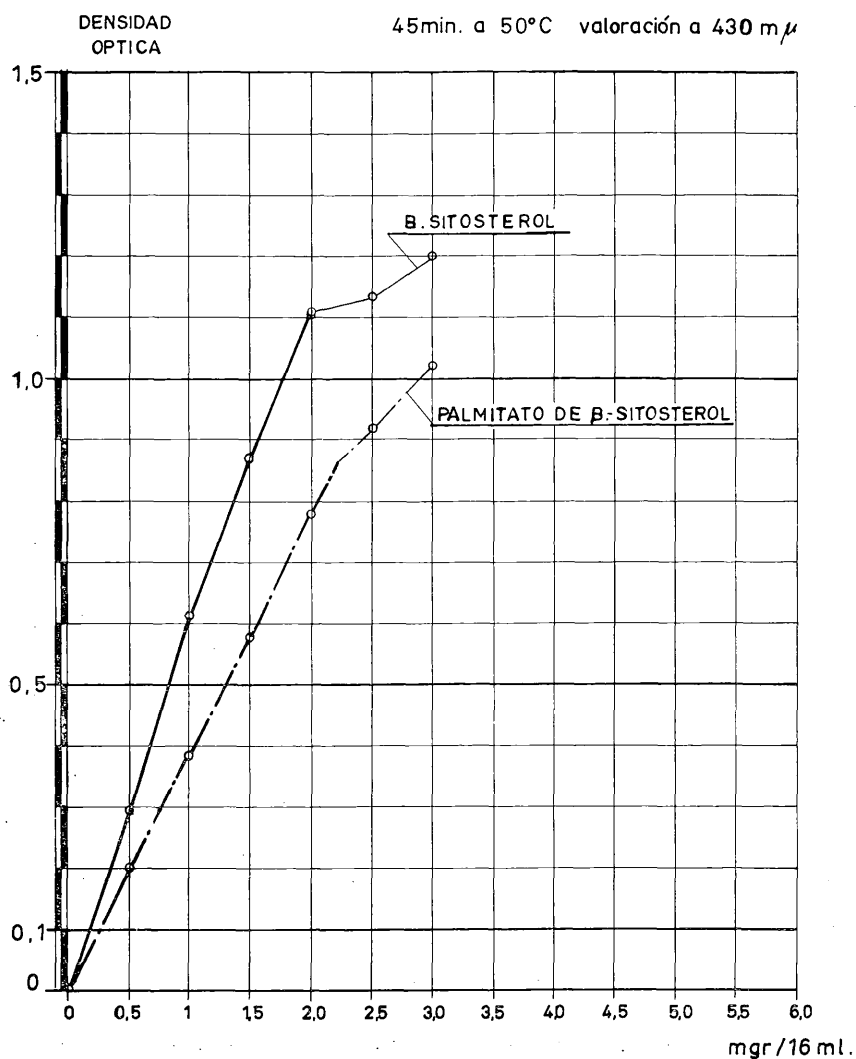


FIGURA 3.

Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por el reactivo estable.

CUADRO II

COMPARACION DE DIFERENTES DETERMINACIONES COLORIMETRICAS
DEL CONTENIDO EN PALMITATO DE SITOSTEROL

MUESTRA		Determinación gravimétrica media — mg./100 g.	DETERMINACION COLORIMETRICA (mg./100 g.)	
T. Durum Porcentaje	T. Aestivum Porcentaje		Reactivo estable	Tchugaeff
100		0,9	0,5 <u>0,5</u> 0,5	0,3 <u>0,3</u> 0,3
90	10	1,9	0,4 <u>0,4</u> 0,4	0,4 <u>0,4</u> 0,4
80	20	3,3	1,5 <u>1,6</u> 1,55	1,5 <u>1,5</u> 1,5
70	30	4,7	2,3 <u>2,4</u> 2,35	3,5 <u>3,6</u> 3,55
60	40	6,4	2,7 <u>2,9</u> 2,8	4,6 <u>4,6</u> 4,6
50	50	7,5	4,5 <u>4,5</u> 4,5	5,5 <u>5,4</u> 5,45
40	60	9,2	5,3 <u>5,1</u> 5,2	6,6 <u>6,3</u> 6,45
30	70	11,3	6,9 <u>6,8</u> 6,85	8,1 <u>7,8</u> 7,95
20	80	13,2	9,4 <u>9,4</u> 9,4	8,8 <u>8,8</u> 8,8
10	90	15,2	10,2 <u>10,3</u> 10,25	10,0 <u>10,0</u> 10,0
	100	17,0	12,1 <u>11,9</u> 12,0	11,6 <u>11,8</u> 11,7

con mezclas de harinas de una variedad de *T. durum* y otra de *T. aestivum*. Se observa que todos los métodos dan valores inferiores a los esperados para las muestras con bajo contenido en *T. aestivum*. Además, para estas muestras, el cociente entre los valores obtenidos por pesada y por colorimetría tiene un valor más alto, lo que indica un mayor contenido en impurezas. Este defecto parece ser inherente al procedimiento seguido para aislar el palmitato de sitosterol.

En el cuadro III se consigna el ensayo de reproductividad de los métodos mencionados. La reproductividad es mayor para los contenidos altos en

CUADRO III

ENSAYO DE REPRODUCTIVIDAD DE LOS METODOS MODIFICADOS

Determinación núm.	MUESTRA NUM. 1			MUESTRA NUM. 2			MUESTRA NUM. 3		
	Gravim. (mg./ 100 g.)	COLORIN. (mg./ 100 g.)		Gravim. (mg./ 100 g.)	COLORIM. (mg./ 100 g.)		Gravim. (mg./ 100 g.)	COLORIM. (mg./ 100 g.)	
		(1)	(2)		(1)	(2)		(1)	(2)
1.....	3,0	2,4	2,0	7,2	6,5	5,1	11,6	9,8	10,0
2.....	4,8	2,3	2,0	8,6	5,8	5,1	12,2	10,7	9,6
3.....	2,8	1,8	2,5	7,6	5,6	5,0	12,0	9,9	10,0
4.....	4,0	1,8	2,4	8,6	6,7	4,9	13,0	10,0	9,4
5.....	3,4	2,0	2,0	6,8	6,8	3,9	10,8	10,0	9,1
Σx	18,0	10,3	10,9	38,8	31,4	24,0	59,6	50,4	48,1
\bar{x}	3,6	2,06	2,18	7,76	6,28	4,80	11,92	10,08	9,62
s.....	0,81	0,28	0,25	0,82	0,54	0,51	0,82	0,36	0,38
$100 \frac{s}{\bar{x}}$ por 100....	22,7	13,5	11,4	10,5	8,7	10,6	6,9	3,5	4,0

(1) Reactivo estable. (2) Tchugaeff.

palmitato y los métodos colorimétricos dan mejores resultados que el gravimétrico. La mayor sensibilidad de la reacción de Tchugaeff no supone una ventaja real, ya que no es aconsejable reducir el tamaño de la muestra debido a los problemas que presenta el procedimiento de aislamiento del precipitado. Hay que tomar una alícuota de la solución clorofórmica del precipitado, que por ser bastante reducida introduce un nuevo error. Esto explica que la reproductividad de los dos procedimientos colorimétricos sea muy similar.

Consistencia de la diferencia interespecífica.

Se ha determinado el contenido en palmitato de sitosterol de un buen número de variedades de *T. aestivum* y *T. durum*, cultivadas en España con

objeto de establecer si la supuesta diferencia interespecífica es significativa y consistente. Los resultados (cuadros IV y V) indican que el contenido en

CUADRO IV

CONTENIDO EN PALMITATO DE SITOSTEROL DE T. AESTIVUM
DETERMINADO COLORIMETRICAMENTE CON EL REACTIVO
ESTABLE

VARIEDAD	mg./100 g.
Dimas.....	11,3
Chamorro.....	11,2
Florencia Aurora.....	11,1
Calatrava.....	10,1
San Rafael.....	10,0
Estrella.....	9,9
Jeja.....	9,8
Mocho.....	9,6
Negrillo.....	9,6
Mentana.....	9,5
Negrete.....	9,5
Pané-2.....	9,2
Rieti.....	9,0
Rojo.....	9,0
Rojo Eslava.....	8,6
Ariana.....	8,4
Blanco Segarra.....	8,4
Cabezorro.....	8,3
País.....	7,1
Aragón 03.....	7,0
Mara.....	1,6
Impeto.....	1,5
Navarro 105.....	1,1
(1) Lérida.....	0,9
Libero.....	0,8
Pané-247.....	0,8

(1) Variedad desconocida procedente de esta localidad.

CUADRO V

CONTENIDO EN PALMITATO DE SITOSTEROL DE T. DURUM DETERMINADO
COLORIMETRICAMENTE CON EL REACTIVO ESTABLE

VARIEDAD	mg./100 g.
Grifoni.....	0,8
Ledesma.....	0,8
Senatore Capelli.....	1,0
Andalucía.....	0,7
Híbrido-D.....	0,6
Híbrido-E.....	0,5

palmitato de la mayoría de las variedades de *T. aestivum* (7,0-11,3 mg/100 g.) es significativamente superior al de las de *T. durum* (0,5-1,0 mg/100 g.), si bien seis de las variedades de *T. aestivum* ensayadas dieron resultados equivalentes a las de *T. durum*.

En el cuadro VI se ha estudiado la variabilidad del contenido en palmitato de sitosterol en muestras de una misma variedad, procedentes de distintas regiones españolas.

A la vista de los resultados que anteceden, puede afirmarse que el con-

CUADRO VI

VARIACIONES EN EL CONTENIDO DE PALMITADO DE SITOSTEROL DENTRO DE CADA VARIEDAD (mg/100 g.)

MUESTRA NUMERO	SENATORE CAPELLI		FLORENCIA AURORA	
	Gravim.	Colorim.	Gravim.	Colorim.
1.....	3,7	1,0	15,2	8,7
2.....	3,0	0,4	12,8	8,0
3.....	2,1	0,4	14,6	9,3
4.....	2,1	0,3	13,0	9,2
5.....	2,9	0,5	11,2	7,1
6.....	2,6	0,5	12,2	8,7
MEDIA....	2,7	0,5	13,1	8,5
INTERVALO...	2,1 — 3,7	0,3 — 1,0	11,2 — 15,2	7,1 — 9,3

tenido en palmitato de sitosterol es un índice de la adición fraudulenta de productos de *T. aestivum* a las pastas alimenticias, ya que dicho contenido es significativamente menor en *T. durum* que en *T. aestivum*. Debido a la existencia de algunas variedades de *T. aestivum* con contenidos similares a las de *T. durum*, un bajo contenido en esta sustancia no garantiza la pureza de la pasta.

RESUMEN

Se ha desarrollado un método mejorado para la determinación del palmitato de sitosterol en las pastas alimenticias, basado en el de Matweef. Se describen las condiciones correctas para la determinación colorimétrica por las reacciones coloreadas de Liebermann-Burchard y Tchugaeff, no siendo adecuada la determinación gravimétrica.

El contenido en palmitato de sitosterol para la mayoría de las variedades de *T. aestivum* (incl. *T. vulgare*) (7,0-11,3 mg/100 g.) es significativamente superior al de todas las de *Triticum durum* ensayadas. Esta sustancia es, por tanto, un buen índice de la presencia de *T. aestivum* en las pastas alimenticias. Su ausencia, sin embargo, no garantiza la pureza.

S U M M A R Y

An improved sitosteryl palmitate assay method has been developed following Matweefs's. Correct conditions for the colorimetric determination by the Liebermann-Burchard and Tchugaeff color reactions are described, the gravimetric determination not being adequate.

Sitosteryl palmitate content for most *Triticum aestivum* (incl. *T. vulgare*) varieties (7,0-11,2 mg./100 g.) is significantly higher than for all *Triticum durum* varieties tested. This substance is therefore a good index of *T. aestivum* presence in paste products. However, absence of this substance does not guarantee purity.

B I B L I O G R A F I A

- ALLIOT, R. (1957): «Contribution à l'étude de la méthode de Matweef, destinée à la détection des farines de blé tendre dans les semoules et pâtes alimentaires», *Ann. Fals. et Fraudes*, 579: 1-9.
- BERGMANN, E.; IKAN, R.; HAREL, S. (1964): «Thin-layer Chromatography of Beta-sitosterol esters», *J. Chromatography*, vol. 15, N° 2, July.
- BROGIONI, M.; FRANCONI, U. (1963): «Indagini spettrofotometriche nell'infrarosso sugli sfarinati di frumento e sulle paste alimentari», *L'industria Pastaria*, 2 (8): 6-17.
- FABRIANI, G.; FRATONI, A. (1955): «Sulla presenza del sitosterolo nelle farine dei grani teneri e duri», *Quaderni della Nutrizione*, 15, 130-41.
- GILLES, K. A.; YOUNG, V. L. (1954): «Evaluation of Durum wheat and Durum Products». II. «Separation and identification of the sitosterol esters of semolina», *Cereal Chem.*, 41 (6), 502.
- GUILBOT, A. (1961): «Untersuchungen über sterolester im Getreide und ihre Bedeutung für die Unterscheidung vom Durum —und Vulgare— Weizen», *Getreide und Mehl*, 5, 50.
- HANEL, DAM. (1955): «Micromethod for cholesterol determination», *Acta Chem. Scand.*, 9, 677.
- HUANG, T.; CHEN, C. P. (1961): «A stable reagent for the Liebermann-Burchard reaction», *Anal. Chem.*, 33, 1405-7.

- MATWEEF, M. (1952): «Détection des farines de blé tendre dans les semoules et pâtes alimentaires», *C. R. Ac. Agr. de France*, 39: 658-662.
- MATWEEF, M. (1964): «Considerazioni sull'utilizzazione della prova del palmitato per la differenziazione de grani duri e teneri», *Tecnica Molitoria* (15), 22: 163-165.
- MONTEFREDINE, A.; LAPORTA, L. (1955): «Differenziazione degli sfarinati di grano tenero e di grano duro», *L'Italia ei Cereali*, 10, 2, 95; 3, 175.
- NESS, A. T.; PASTEWKA PEACOCK, A. C. (1964): «Evaluation of a new Liebermann-Burchard reagent Clin», *Chem. Acta*, 10 (3), 229.
- SPIELMAN, M. A. (1933): «The sitosterol esters in wheat flour oil», *Cereal Chem.*, 10: 239-242.
- WALDE, A. W.; MANGELS, C. E. (1930): «Variation in properties of acetone extracts of common and durum wheat flours. A preliminary report», *Cereal Chem.*, 7: 480-486.
- ZOUBOVSKY, P. (1958): «Constatations experimentales concernant la détection par la méthode Matweef des produits de blés tendres dans les semoules de blés durs», *Pâtes Aliment., Semoules et Ind.*, 77: 4.